

令和元年6月19日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09393

研究課題名(和文) 亜鉛の腸膵循環と膵機能における役割

研究課題名(英文) Role of zinc in intestinal-pancreatic circulation and pancreatic function

研究代表者

山本 明子 (Yamamoto, Akiko)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・准教授

研究者番号：60402385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛は多くのタンパク質の活性中心であり、欠乏すると全身に様々な障害を引き起こす。一方、タンパク質に結合していないfreeのZn²⁺は、イオンチャネルの阻害などの金属毒性を持つ。亜鉛は、小腸で吸収され、主に膵液中に排泄されるという特徴的な腸膵循環を示す。亜鉛欠乏と膵外分泌機能障害の関連は以前から知られているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、亜鉛がその集積臓器である膵導管細胞(膵外分泌腺)の機能に果たしている役割と膵臓に発現している亜鉛トランスポーターについて検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

亜鉛は、生命に必須の微量元素であり、多くのタンパク質の活性中心である一方、タンパク質に結合していないfreeのZn²⁺は、イオンチャネルの阻害などの金属毒性を持つ。そのため生体はZn²⁺の毒性から自身を守る仕組みを備え、体内亜鉛は小腸から吸収され膵液を介して腸管に排泄される腸膵循環し、正確にコントロールされている。亜鉛トランスポーターは膵臓の導管細胞に発現し、生体内亜鉛をコントロールしている可能性が示唆された。亜鉛欠乏と膵外分泌機能障害が関連するメカニズムは不明であるが、freeのZn²⁺が過剰になると膵液分泌を抑制するが、膵液分泌には少量の亜鉛は不可欠であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Zinc ion resides is the active center of many types of proteins and zinc deficiency leads to various disorders in the body. The Zn ions, which are not bound to proteins, have metal toxicity such as inhibition of ion channels. Zinc exhibits a characteristic intestinal-pancreatic circulation that zinc is absorbed in the small intestine and excreted mainly in the pancreatic juice. The relationship between zinc deficiency and exocrine pancreatic dysfunction has long been known, but the mechanism is largely unknown. In this study, we examined the direct effects of zinc ion on the physiological function of pancreatic duct cells and the expression of zinc transporter (Zip and ZnT) in pancreas.

研究分野：膵外分泌

キーワード：膵外分泌 亜鉛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2013年の国民健康・栄養調査によると、亜鉛の摂取不足は20～60歳代に顕著であり、亜鉛欠乏はもはや高齢者だけの問題ではなく国民病である。亜鉛欠乏による障害としては、耐糖能異常、味覚障害、免疫不全、創傷治癒遅延などがよく知られているが、若年成人の亜鉛不足は、月経障害や不妊症、10歳代での摂食障害で生じる亜鉛不足では性成熟遅延といった重大な問題が生じる。亜鉛は、多くのタンパク質の活性中心であるとともに、細胞内情報伝達を担っており、生命に必須の微量元素である。一方、タンパク質に結合していないfreeの Zn^{2+} は、イオンチャネルの阻害などの金属毒性を持つ。そのため、生体は、必要とする細胞に Zn^{2+} を効率的に集積させる仕組みとともに、輸送中の Zn^{2+} の毒性から自身を守る仕組みを備えている必要がある。

亜鉛は、腸肝循環（小腸から吸収され膵液を介して腸管に排泄される）する唯一の物質である。亜鉛の生体内での恒常性は、亜鉛応答性転写因子MTF-1を介する（Weaver *et al. Biol Chem* 2007）小腸上皮と膵臓における亜鉛トランスポータと亜鉛結合低分子有機体であるメタロチオンイン（MT）の発現量と局在の調節によってコントロールされていると考えられている。亜鉛トランスポータには、細胞質内の亜鉛を増加させる向きに働くZipファミリーと細胞質内の亜鉛を減少させる向きに働くZnTファミリーがある。

亜鉛の欠乏と、亜鉛が集積する臓器である膵臓の内外分泌機能障害が関連することは以前から知られている。耐糖能異常については、インスリン6量体の安定化に Zn^{2+} が必要であることから説明されてきたが、最近、膵β細胞のインスリン分泌顆粒中に亜鉛を組み入れるZnT8のノックアウトマウスが耐糖能異常を示すことが報告された（Tamaki *et al. J Clin Invest* 2013）。このマウスでは、分泌顆粒内の亜鉛が枯渇し、正常なインスリン構造が作られないため、肝臓でインスリンの分解が促進される。一方、亜鉛欠乏と膵外分泌機能障害が関連するメカニズムは不明である。消化吸収障害が起こる非代償期の慢性膵炎や膵広範切除後では、亜鉛の吸収障害と血清亜鉛の低下が生じるとされている。また、マウスを用いた研究（Wong *et al. J Nutr Biochem* 2013）から、高齢者における亜鉛欠乏の原因は、食事摂取量の低下と吸収障害であることが示唆されている。しかし、膵消化酵素分泌の減少が、食餌中のタンパク質に含まれる亜鉛の吸収障害を引き起こすメカニズムは不明である。一方、膵腺房細胞にはZIP5、ZnT1、ZnT2が発現し（Guo *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 2010）亜鉛を集積させる仕組みが整っており、亜鉛の欠乏が、膵腺房細胞の酵素分泌障害を引き起こしている可能性は高いが、これまで検討されていない。また、膵液中では亜鉛が濃縮された状態で存在するが、毒性を持つfreeの Zn^{2+} が膵導管上皮に及ぼす影響について検討されたことはない。

2. 研究の目的

膵をめぐる亜鉛の循環は、以下の2つのルートが存在するが、本研究は（1）外分泌腺をめぐる亜鉛輸送について、生理的意義および消化吸収不良に伴う順応と破たんメカニズムを明らかにすることを目的とする。

- （1）小腸で吸収 膵腺房細胞に集積（ Zn^{2+} 濃度によるZIPとZnTの発現調節） 腺房細胞のチモーゲン顆粒にMTとともに蓄えられる（ Zn^{2+} 濃度によるMTとZnTの発現調節） 開口放出 膵液中ではMTが Zn^{2+} の毒性を抑える 腸管へ排泄
- （2）膵β細胞に集積（ Zn^{2+} 濃度によるZIPとZnTの発現調節）→インスリン顆粒に蓄えられる（ Zn^{2+} 濃度によるZnTの発現調節、 Zn^{2+} によるインスリン6量体の安定化）→開口放出→門脈中でも Zn^{2+} によるインスリン6量体の安定化→肝臓にトラップされずに末梢へ→

膵液中の消化酵素は腺房細胞から開口放出によって分泌され、高濃度の HCO_3^- を含むアルカリ性の液体成分は導管の上皮細胞（導管細胞）から分泌される。導管細胞からの HCO_3^- 分泌はapical membraneに局在するCFTRに依存する。 HCO_3^- と水の分泌量が低下すると、膵液中のタンパクが沈殿しやすくなり膵液が粘稠化するため、膵液がうっ滞し腺房細胞も障害される。ZIPおよびZnTの適切な発現調節により膵腺房細胞に Zn^{2+} を集積させて、効率のよい酵素分泌を実現させ、膵液中では Zn^{2+} の毒性から導管細胞を保護するための機構が存在していると考えられる。

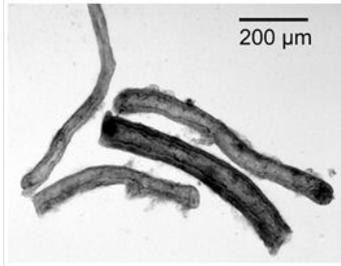
本研究では、

- （1）モルモット膵臓から膵導管細胞を単離し、 HCO_3^- ・水分泌について、亜鉛の急性投与の影響とアルブミンの作用を解析する。
- （2）モルモット膵臓及び膵管からmRNAを抽出し、亜鉛トランスポータについて解析を行う。
- （3）マウスに亜鉛欠乏の食餌を投与し、膵導管細胞機能に対する亜鉛欠乏の慢性的な影響について検討する。

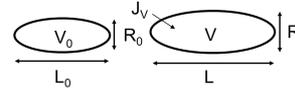
3. 研究の方法

（1）モルモットから膵臓を摘出し、コラゲナーゼで処理した後、実体顕微鏡下で直径約100 μ mの小葉間膵管を単離した。

培養前



培養後



$$R/R_0 \approx L/L_0$$

$$V/V_0 = (A/A_0)^{1.5}$$

$$J_v = (V_{n+1} - V_n)/E$$

J_v : Fluid secretory rate per unit area of epithelium (nl min⁻¹ mm⁻²)

E: Luminal surface area of the epithelium

5% CO₂ 存在下で 37 °C にて約 3 時間培養すると、両端が自然に閉じて内腔に分泌液が貯留した状態となる。内腔に分泌液が貯留した膵管を倒立顕微鏡のステージ上で、37 °C で HCO₃⁻ CO₂ 緩衝液にて表層還流し、経時的に明視野像を取得し、管腔内容積の変化から水分分泌速度を求め、膵管上皮の単位表面積あたりで表した。

(2) 膵臓及び膵管から mRNA を抽出し、Zip (1、2、4、5、6、7、8、14) 及び ZnT1 トランスポートについて RT-PCR を行った。

(3) C57BL/6 マウスに、生後 6 週より CA-1 (高たんぱく粉末飼料、日本クレア) 8 週より CE-2 (スタンダード粉末飼料、日本クレア) 9 週から 7 日間 CE-2 又は F2ZnDD (亜鉛欠乏粉末飼料、オリエンタル酵母工業) を与えた。膵臓を摘出し、(1) と同様に、小葉間膵管を単離し、一昼夜培養し、両端が閉じて内腔に分泌液が貯留した単離膵管を用いて、管腔内容積の変化から水分分泌速度を求め、膵管上皮の単位表面積あたりで表した。

マウス飼料

基本組成	CE-2 (%)	CA-1 (%)	F2ZnDD(%)
水分 (Moisture)	8.84	8.48	
粗タンパク質 (Crude protein)	25.48	27.09	
粗脂肪 (Crude fat)	4.61	4.69	
粗繊維 (Crude fiber)	5.14	4.54	
粗灰分 (Crude ash)	7.01	7.92	
可溶性無窒素物 (NFE)	48.62	47.28	
エネルギー (kcal)	339.10	339.70	
硬度 (kg/cm ²)	27.60	24.70	
卵白粉末			20.00
デキストロース			63.70
コーンオイル			10.00
セルロースパウダー			2.00
ミネラル混合			3.13
ビタミン混合			1.17
	99.70	100.00	100.00

ミネラル混合 (100 g 中)	CE-2 (%)	CA-1 (%)	F2ZnDD(%)
Ca	1.18000	1.54000	
P	1.10000	1.32000	
Mg	0.34000	0.32000	
K	1.07000	0.86000	
Mn	0.01067	0.01133	
Fe	0.03010	0.02990	
Cu	0.00085	0.00078	
Zn	0.00687	0.00700	
Na	0.34000	0.42000	
Ca/P	1.07000	1.17000	
Ca/Mg	3.47000	4.83000	
K/Na	3.18000	2.07000	
NaCl			0.55558
K ₂ HPO ₄			1.06921
MgSO ₄			0.16526
CaHPO ₄			0.24915
CaCO ₃			0.99503
Fe-Citrate			0.09108
KI			0.00263
MnSO ₄ · 4-5H ₂ O			0.00088
CuSO ₄ · 5H ₂ O			0.00100
CoCl ₂ · 6H ₂ O			0.00019
	11.79849	12.57901	3.13000

ビタミン混合(100g中)	含有量	CE-2	CA-1	F2ZnDD
ビタミンA	(IU)	1,515.0000	2,730.0000	999.9990
ビタミンD3	(IU)	260.0000	290.0000	124.9560
ビタミンE	(mg)	7.1000	7.5000	10.9980
ビタミンK3	(mg)			0.0330
ビタミンB1	(mg)	1.7000	1.9000	1.0004
ビタミンB2	(mg)	1.4000	1.4000	0.6002
ビタミンB6	(mg)	1.3000	1.2000	0.4001
ビタミンB12	(mg)	6.0000	6.2000	0.0020
ビタミンC	(mg)	22.5000	23.0000	
イノシトール	(mg)	626.0000	565.0000	
ピオチン	(mg)	0.0542	0.0528	0.4001
葉酸	(mg)	0.2000	0.2000	0.0500
パントチン酸カルシウム	(mg)			1.6006
パントテン酸	(mg)	2.7000	2.4000	
ナイアシン	(mg)	18.5000	19.6000	
ニコチン酸	(mg)			2.5003
塩化コリン	(g)			0.1498
コリン	(mg)	185.0000	200.0000	

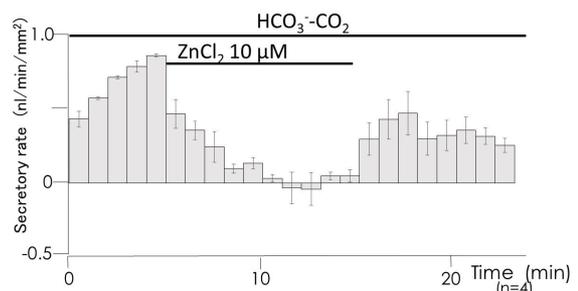
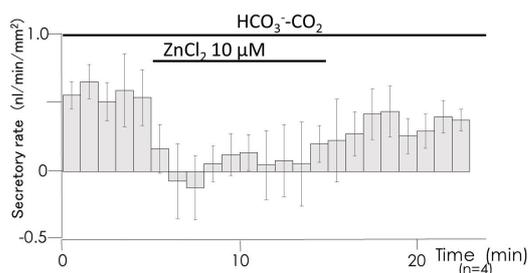
4. 研究成果

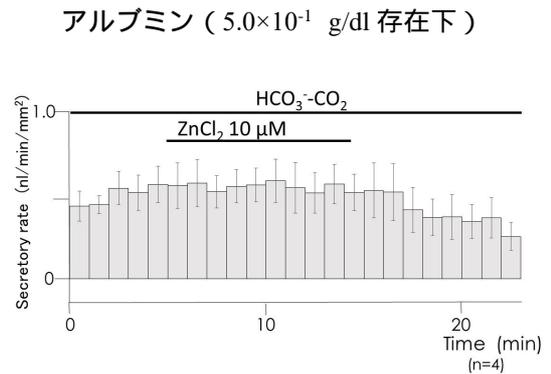
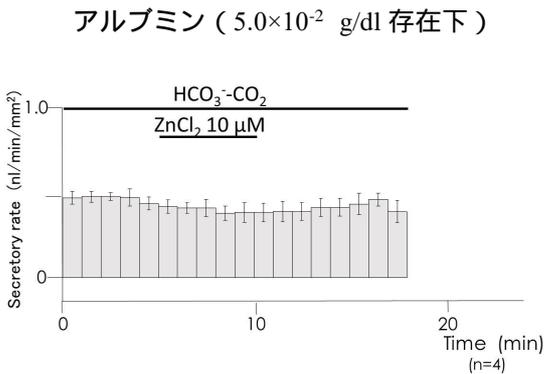
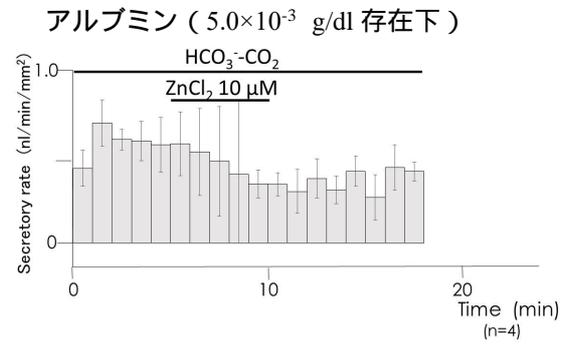
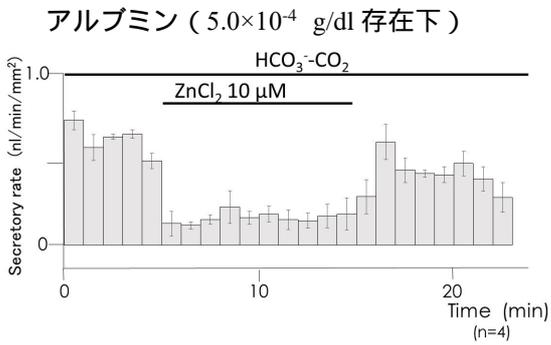
(1) 亜鉛の急性投与の影響および亜鉛は血中では亜鉛はアルブミンと結合しているため、アルブミンの作用を解析した。アルブミン非存在下及びアルブミン(5.0×10⁻⁵ ~ 5.0×10⁻¹ g/dl)存在下で、ZnCl₂ (10 μM) を表層灌流液に加えると、水分分泌(基礎分泌)速度は各々96.2、90.8、80.4、29.2、15.1%減少した(n=4)。0.5 g/dl (ヒトの血中濃度の約 1/10) のアルブミン存在下では、ZnCl₂ (10 μM) を加えても水分分泌量は変化しなかった。

forskolin (10 μM) 刺激下アルブミン非存在下での水分分泌速度は 1.23 ± 0.11 nl min⁻¹ mm⁻² (mean ± SD, n=4) であり、ZnCl₂ (10 μM) を表層灌流液に加えると 54.6 ± 8.9%減少した。

アルブミン非存在下

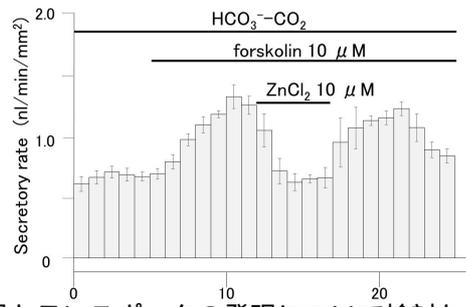
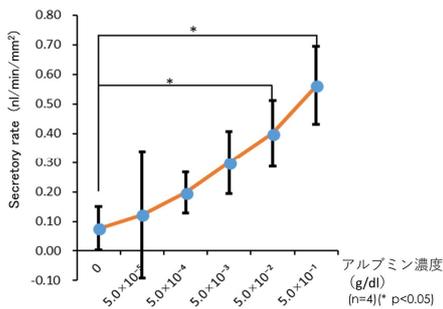
アルブミン (5.0×10⁻⁵ g/dl 存在下)





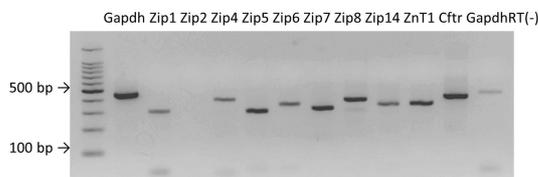
モルモット膵管の膵液分泌における各濃度アルブミン存在下での $ZnCl_2$ ($10 \mu M$) の影響

モルモット forskolin ($10 \mu M$) 刺激下アルブミン非存在下での水分分泌速度

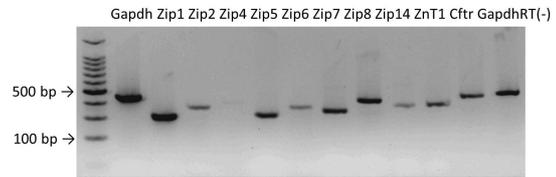


(3) モルモット全膵および膵導管細胞における亜鉛トランスポータの発現について検討した。Control として膵導管細胞の apical membrane に発現する Cftr (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)を用いた。全膵では解析した全ての亜鉛トランスポータの mRNA 発現が認められたが、膵導管では Zip2 の発現が認められなかった。一方、膵導管で明らかな発現が認められた Zip4 は、全膵でのバンドは薄かった。

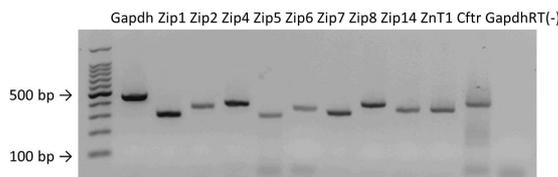
膵導管細胞



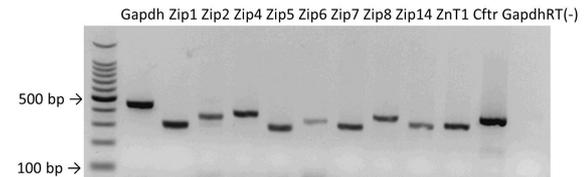
膵臓



肝臓



小腸

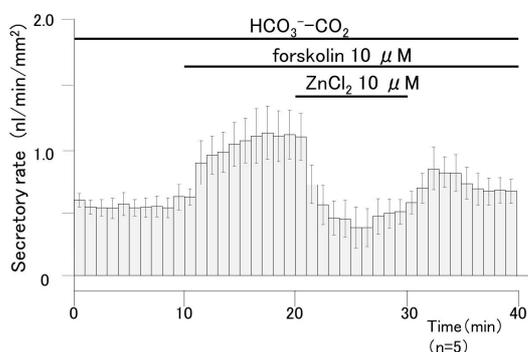


モルモット臓器の PCR 結果のまとめ

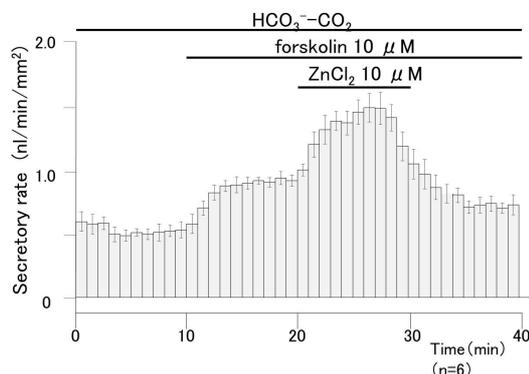
遺伝子名	膵導管細胞	膵臓	肝臓	小腸
Zip1	+	++	++	+
Zip2	-	+	+	+
Zip4	+	+-	++	+
Zip5	+	+	+	+
Zip6	+	+	+	+
Zip7	+	+	+	+
Zip8	+	+	+	+
Zip14	+	+	+	+
ZnT1	+	+	+	+
Cftr	++	+	+	++

(4) マウス単離小葉間膵管の水分泌に対して慢性的な亜鉛欠乏が及ぼす影響を検討するために、通常（亜鉛含有）食を与え続けたマウスの膵管では、forskolin (10 μM) 刺激下の水分泌速度は $1.08 \pm 0.39 \text{ nl min}^{-1} \text{ mm}^{-2}$ (mean \pm SD、n=5) であり、 ZnCl_2 (10 μM) を表層灌流液に加えると $41.5 \pm 11.3\%$ 減少した ($p < 0.05$)。亜鉛欠乏食を7日間与えたマウスの膵管の forskolin 刺激下の水分泌速度 (0.91 ± 0.05 、n=6) は通常食に比べて有意に ($p < 0.05$) 遅く、 ZnCl_2 を表層灌流液に加えると $66.6 \pm 7.8\%$ 増加した ($p < 0.05$)。

) 通常（亜鉛含有）食を与え続けたマウスの膵管の水分泌



) 亜鉛欠乏食を7日間与えたマウスの膵管の水分泌



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

【肝胆膵とアルコール-serendipity を目指して-】アルコール性膵炎 アルコール性膵障害の分子機序 石黒 洋、山本明子 肝・胆・膵 76: 121-126, 2018. 査読無し

Bicarbonate-rich fluid secretion predicted by a computational model of guinea-pig pancreatic duct epithelium. M. Yamaguchi, MC. Steward, K.Smallbone, Y.Soma, A. Yamamoto, SB.Ko, T. Kondo, H. Ishiguro. *J Physiol.* 595: 1947-1972, 2017. 査読有り

(doi: 10.1113/JP273306. Epub 2017 Feb 8.)

Caffeine inhibits fluid secretion by interlobular ducts from guinea pig pancreas. Y.Mochimaru, A. Yamamoto, M.Nakakuki, M. Yamaguchi, I.Taniguchi, H. Ishiguro. *Pancreas.* 46: 549-556, 2017. 査読有り (doi:10.1097/MPA.0000000000000782.)

知っておきたい稀な肝胆膵疾患 嚢胞性線維症 石黒 洋、藤木理代、中莖みゆき、近藤志保、谷口いつか、宇佐見祐加、成瀬達、山本明子 肝・胆・膵 73: 451-459, 2016. 査読無し

[学会発表](計 14 件)

単離小葉間膵管の水分泌に亜鉛とアルブミンが及ぼす影響と亜鉛トランスポータの発現 野村奈央、山本明子、中莖みゆき、石黒 洋 第 49 回日本膵臓学会大会 (和歌山) 2018・6

「ワークショップ 14：基礎研究から紐解く膵・胆道の恒常性とその破綻」cystic fibrosis マウスの単離膵管における $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ 輸送 山本明子、谷口いつか、石黒 洋 第 104 回日本消化器病学会総会 (東京) 2018・4

NH_4^+ および AcO -パルスによる膵導管細胞内 pH 変化のコンピュータ・シミュレーション 石黒 洋、山口 誠、スチュワード マーチン、山本明子 第 95 回日本生理学会大会 (高松) 2018・3

モルモット単離小葉間膵管の水分泌にアルブミンと亜鉛が及ぼす影響 山本明子、中莖みゆき、石黒 洋 第 59 回日本消化器病学会大会 DDW-Japan2017 (福岡) 2017・10

モルモット膵導管細胞の液体分泌に及ぼすカフェインとエタノールの影響 持丸由香、山本明子、中莖みゆき、山口 誠、谷口いつか、石黒 洋 第 48 回日本膵臓学会大会 (京都)

2017・7

多発性嚢胞腎症ラットの膵管内 primary cilia の形態と機能 衣 蘭娟, 山本明子, 長尾枝澄香, 成瀬 達, 石黒 洋 第 48 回日本膵臓学会大会 (京都) 2017・7

パネルディスカッション9 アルコール性臓器障害発症の分子機序と治療への応用 「膵導管細胞機能に対するアルコールとカフェインの影響」石黒 洋, 藤木理代, 山本明子 第 103 回日本消化器病学会総会 (東京) 2017・4

嚢胞性線維症マウスの小葉間膵管における重炭酸輸送 谷口いつか, 山本明子, 山口 誠, 持丸由香, 小澤祐加, 野村 奈央, 石黒 洋 第 94 回日本生理学会大会 (浜松) 2017・3

Basement membrane を有する膵導管細胞モデルの構築 山口 誠, スチュワード マーチン, 相馬義郎, 山本明子, 石黒 洋 第 94 回日本生理学会大会 (浜松) 2017・3

膵導管細胞の水分分泌に亜鉛が及ぼす影響 山本明子, 中莖みゆき, 石黒洋 第 58 回日本消化器病学会大会 DDW-Japan2016 (神戸) 2016.11

自己免疫性膵炎における便中エラストラーゼ測定の有用性 上野泰明, 成瀬達, 濱田広幸, 伊藤 治, 山本明子, 石黒洋 第 230 回日本内科学会東海支部主催東海地方会 (名古屋) 2016

Morphology of primary cilia in pancreatic duct of the polycystic kidney rat. L. Yi, H.Ishiguro, A.Yamamoto, M.Nakakuki, S.Furuya, S.Nagao, M.Wei and S.Naruse The 47th annual meeting of the Japan Pancreas Society(JPS) The 20th meeting of the International Association of Pancreatology (IAP) The 6th meeting of the Asian Oceanic Pancreatic Association(AOPA) 2016.8
Role of CFTR dysfunction in the pathogenesis of chronic pancreatitis. A.Yamamoto, S.Kondo, K.Fujiki, M.Nakakuki, Y.Kondo, I.Taniguchi, Y.Usami, S.Naruse and H.Ishiguro The 47th annual meeting of the Japan Pancreas Society(JPS) The 20th meeting of the International Association of Pancreatology(IAP) The 6th meeting of the Asian Oceanic Pancreatic Association(AOPA) 2016.8

浸透圧性緩下剤の経口投与は嚢胞線維症マウスの生存率を改善させた 谷口いつか, 山本明子, 山口誠, 持丸ゆか, 石黒洋 第 93 回日本生理学会大会合同大会 (札幌) 2016.3

〔図書〕(計 4 件)

導管細胞 新膵臓病学(下瀬川 徹 編)石黒 洋 p31-35 南江堂(東京)2017

膵石形成機序 新膵臓病学(下瀬川 徹 編)石黒 洋 p93-96 南江堂(東京)2017

Cystic Fibrosis 新膵臓病学(下瀬川 徹 編)石黒 洋 p423-428 南江堂(東京)2017

化学物質による膵炎 新膵臓病学(下瀬川 徹 編)石黒 洋 p456-457 南江堂(東京)2017

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 石黒 洋

ローマ字氏名: ISHIGURO HIROSHI

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: 総合保健体育科学センター

職名: 教授

研究者番号(8桁): 90303651

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。